

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК 57.04 57.055 58.02 754.174
ГРНТИ 34.31.15 34.23.35 34.15.61 34.03.94
Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:
Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»
От имени Руководителя организации _____/_____ М.П.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении 4 этапа Государственного контракта
№ 14.740.11.1032 от 23 мая 2011 г.

Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»
Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.2 Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук.
Проект: Адаптационные процессы в биологических системах: морфофизиологические и популяционно-генетические аспекты
Руководитель проекта: _____/Кутлунина Наталья Анатольевна (подпись)

Екатеринбург
2012 г.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ
по Государственному контракту 14.740.11.1032 от 23 мая 2011 на выполнение
поисковых научно-исследовательских работ для государственных нужд

Организация-Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Руководитель темы:

кандидат биологических
наук, доцент

_____ Кутлунина Н. А.
подпись, дата

Исполнители темы:

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Ермошин А. А.
подпись, дата

кандидат биологических
наук, доцент

_____ Киселёва И. С.
подпись, дата

кандидат биологических
наук, доцент

_____ Зимницкая С. А.
подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Кондратков П. В.
подпись, дата

доктор географических
наук, профессор

_____ Борисова Г. Г.
подпись, дата

кандидат биологических
наук, без ученого звания

_____ Чукина Н. В.
подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Пермякова М. В.
подпись, дата

кандидат биологических
наук, без ученого звания

_____ Фролов И. В.
подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Гуркин Е. А.
подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Жеребцова М. И.
подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Неустроева Н. В.
подпись, дата

кандидат биологических
наук, без ученого звания

_____ Беляев А. Ю.
подпись, дата

Реферат

Отчет 40 с., 1 ч., 10 рис., 2 табл., 33 источн., 0 прил.

стресстолерантность , *NICOTIANA TABACUM L.* , трансгенные растения , ген *HMG1* , мезоструктура листа , фитостерины , фитопатогены , паракват , ионы меди

В отчете представлены результаты исследований, выполненных по 4 этапу Государственного контракта № 14.740.11.1032 "Адаптационные процессы в биологических системах: морфофизиологические и популяционно-генетические аспекты" (шифр "2011-1.2.2-141-005") от 23 мая 2011 по направлению "Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук в следующих областях:- общая биология и генетика;- физико-химическая молекулярная и клеточная биология;- фундаментальная медицина и физиология" в рамках мероприятия 1.2.2 "Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук.", мероприятия 1.2 "Проведение научных исследований научными группами под руководством докторов наук и кандидатов наук" , направления 1 "Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий." федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы.

Цель работы - Цель проекта состоит в выявлении закономерностей и особенностей адаптациогенеза растений на разных уровнях организации от молекулярно-генетического до популяционного в условиях воздействия стрессоров различной природы.

Проект носит междисциплинарный характер и предполагает интеграцию традиционных и инновационных подходов и методов: популяционно-генетических, физиологических, эмбриологических, цитологических и молекулярно-генетических. Такой комплексный подход позволит выявить механизмы формирования преадаптаций на уровне клеток, организмов и популяций.

Целью четвертого этапа являлось изучение роли экспрессии гетерологичных генов в стресстолерантности растений.

В соответствии с заявленной целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучение трансгенных линий растений, экспрессирующих гетерологичные гены *hmg1*, которые отвечают за синтез фитогормонов, регулирующих метаболические процессы, в том числе в стрессовых условиях.
2. Сравнение трансгенных линий *Nicotiana tabacum* между собой и с контролем для выявления роли экспрессии генов в формировании

неспецифической устойчивости.

Использован комплексный подход к оценке реакций трансгенных растений к действию стрессоров:

1. Анализ показателей мезоструктуры (структура фототрофных тканей листа, количественное описание мезофилльных клеток и хлоропластов) проводили на растительном материале, фиксированном в 80% этаноле. Для фиксации использовали около 10-15 листовых высечек из листьев каждой трансгенной линии и контрольного. Определение количественных показателей мезофилла листа проводили в 30-ти кратной повторности согласно методике, разработанной в УрГУ на кафедре физиологии и биохимии растений [Мокроносов, Борзенкова, 1978]. Исследования проводили с использованием микроскопа тринокулярного МТ 4000 (Япония) с цифровой видеокамерой CAM V-400 (Япония) и программным обеспечением "SIAMS MESO PLANT" 610.

2. Определение интенсивности перекисного окисления липидов проводили по общепринятой методике с использованием реакционной среды, содержащую трихлоруксусную и тиобарбитуровую кислоты (Методы оценки устойчивости..., 2007), по содержанию ТБК-реагирующих продуктов.

3. Определение активности ферментов-антиоксидантов: СОД, пероксидазы и содержания низкомолекулярного антиоксиданта пролина. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом, основанном на измерении ингибирования фотохимического восстановления нитросинего тетразолия (Beauchamp, Fridovich, 1971).

Активность гваякол-специфичной пероксидазы оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола (Chance, Maehly, 1955).

Содержание пролина определяли по общепринятой методике (Bates, 1978) с использованием ациднингидринового реактива.

Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Достоверность результатов оценивали при уровне значимости $p < 0.05$.

Ресурсы научной библиотеки, в т.ч. доступ к электронным документам (статьи, патенты, базы данных). 2. Собственные экспериментальные данные и методические наработки; 3. Материально-техническая база: - цифровой медицинский UV-VIS спектрофотометр PD 303 UV "APEL", - микроскоп тринокулярный МТ 4000 с цифровой видеокамерой CAM V-400 и программным обеспечением "SIAMS MESO PLANT" 610, - центрифуга с охлаждением 3-18K "Sigma", - стандартное лабораторное оборудование общего назначения.

1. Экспрессия гетерологичного гена *hmg1* влияет на организацию

фототрофных тканей листа табака: упаковка клеток мезофилла в листе всех трансгенных линий более плотная, чем у контрольных растений. У смысловых растений большая плотность мезофилла достигается за счёт увеличения объёма клеток губчатой ткани, у антисмысловых – за счёт роста числа клеток и уменьшения толщины листа.

2. Растения табака со смысловой копией гена *hmg1* обладают большей устойчивостью к действию стрессов биотической (фитопатогены) и абиотической (гербицид паракват и ионы меди) природы, чем контрольные растения, что подтверждается более низким уровнем ПОЛ и увеличением содержания свободного пролина. Антисмысловые линии по устойчивости к патогенам не отличаются от контроля, что может быть связано со слабым ингибированием экспрессии гена *hmg1* при использовании стратегии антисмысловых РНК.

3. Трансгенные растения не отличались от контрольных по качественному составу стерина, но отличались по их количеству. Листья смысловых линий до цветения содержали в 1,5 раза больше стерина, чем контрольные и антисмысловые, а семена – на 50%. Во время цветения количество стерина в листьях смысловых и контрольных растений не отличалось, а у антисмысловых снижалось на 20%. В корнях содержание стерина не отличалось у всех форм.

4. Показано, что обработка листовых высеков раствором сульфата меди (100 мкМ) в течение 20 ч негативно сказывалась на пигментном комплексе контрольных листьев табака. Происходила деструкция хлорофиллов и снижение содержания каротиноидов. При использовании стратегии антисмысловых РНК происходило подавление экспрессии гена *hmg1* и снижение синтеза мевалоната в клетках трансгенных линий табака A1 и A2. Это привело к более заметным изменениям пигментного комплекса при стрессе – большей деструкции хлорофиллов и каротиноидов, изменению соотношений хлорофиллов а/б и хлорофиллы/каротиноиды. Усиление биосинтеза мевалоната за счёт введения дополнительной копии гетерологичного гена *hmg1* под контролем сильного вирусного промотора в смысловых линиях растений снижало негативное действие ионов меди на пигментный комплекс, а также стимулировало биосинтез пигментов.

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	9
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	11
<i>РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В СТРЕСС-ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ.....</i>	
<i>Аналитический обзор Изучение трансгенных линий растений, экспрессирующих гетерологичные гены <i>hmg1</i>, <i>tms1</i>, <i>tmr1</i></i>	11
Природные изопреноидные соединения	11
Мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов	12
Роль 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы в биосинтезе мевалоновой кислоты	13
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	17
<i>Сравнение трансгенных линий <i>Nicotiana tabacum</i> между собой и с контролем для выявления роли экспрессии генов в формировании неспецифической устойчивости.</i>	
Результаты экспрессии гетерологичного гена <i>hmg1</i> в трансгенных линиях <i>Nicotiana tabacum</i> L.	17
Содержание суммы стеренов в тканях трансгенных линий табака	17
Изменения в структуре мезофилла листа трансгенных растений	18
Устойчивость растений к стрессовым факторам	23
Устойчивость к фитопатогенам	23
Реакция трансгенов табака на окислительный стресс, вызванный паракватом	28
Роль модифицированной экспрессии гена <i>hmg1</i> в устойчивости пигментного комплекса трансгенных растений табака к действию ионов меди	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	36
Список литературы	38
<i>Апробация результатов исследований на научных конференциях</i>	40
<i>Организация стажировок молодых участников проекта в ведущих научных центрах России и зарубежных стран</i>	40

Список принятых сокращений

<i>hmgI</i>	- ген 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы
k.b., т.п.н.	- тысяча пар нуклеотидов
<i>nos</i>	- ген нопалинсинтазы
<i>nptII</i>	- ген неомицинфосфотрансферазы II
асДНК	- антисмысловая ДНК
асРНК	- антисмысловая РНК
БАП	- бензиламинопурин
БСА	- бычий сывороточный альбумин
ВМЦК	- вирус мозаики цветной капусты
ГГПФ	- геранилгеранилпирофосфат
ГПФ	- геранилпирофосфат
ГФПФ	- геранилфарнезилпирофосфат
ДМАПФ	- диметилаллилпирофосфат
дНТФ	- дезоксинуклеотидтрифосфаты
ДСН	- додецилсульфат натрия
ИПФ	- изопентинилфосфат
ИППФ	- изопентенилпирофосфат
ИУК	- индолилуксусная кислота
МВК	- мевалоновая кислота
НУК	- нафтилуксусная кислота
ОМГК	- 3-окси-3-метилглутарил-КоА
ОМГКР	- 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктаза
п.н.	- пара нуклеотидов
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
СОД	- супероксиддисмутаза
ФПФ	- фарнезилпирофосфат
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР	- эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

Растения характеризуются удивительно богатым вторичным метаболизмом. Один из крупнейших и многофункциональных классов вторичных метаболитов – изопреноиды. В настоящее время он насчитывает более 20 тысяч индивидуальных веществ и с каждым годом этот список расширяется. К классу изопреноидных соединений относятся многие растительные гормоны (фитогормоны) – абсцизовая кислота, гиббереллины, брассиностероиды, цитокинины. Молекулы, связанные с основным метаболизмом растений, такие как каротиноиды, фитол хлорофиллов, стерины мембран, убихиноны и пластохиноны также имеют изопреноидную природу. Соединения специфического обмена веществ: стероидные гликоалкалоиды, сесквитерпеновые фитоалексины и фитонциды, изопрен, компоненты эфирных масел и другие – тоже принадлежат классу изопреноидов.

В растениях существует два метаболических пути синтеза изопреноидов – ацетатно-мевалонатный, локализованный в цитоплазме клетки и эритрозофосфатный, реализующийся в хлоропласте.

Изучение ацетатно-мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов представляет особый интерес в связи с тем, что через данный метаболический путь синтезируются фитогормоны цитокинины, брассиностероиды и стерины мембран, участвующие в регуляции роста и развития растений, а также в формировании неспецифической устойчивости к стрессорам различной природы. Кроме того, из мевалоновой кислоты образуются сесквитерпены, многие из которых являются фитоалексинами и аттрактантами, а так же возможно имеют и антиоксидантную функцию. Данный метаболический путь начинается с конденсации ацетил-КоА в мевалоновую кислоту, катализируемую 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазой, кодируемой генами семейства *hmg1*.

Цель данного исследования – выявление роли гетерологичного гена

hmg1 в обеспечении устойчивости трансгенных растений к действию стрессоров различной природы.

Задачами данного этапа были:

1. Изучение трансгенных линий растений, экспрессирующих гетерологичные гены *hmg1*, которые отвечают за синтез фитогормонов, регулирующих метаболические процессы, в том числе в стрессовых условиях.

2. Сравнение трансгенных линий *Nicotiana tabacum* между собой и с контролем для выявления роли экспрессии генов в формировании неспецифической устойчивости.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ «РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В СТРЕССТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ»

**Аналитический обзор *Изучение трансгенных линий растений,
экспрессирующих гетерологичные гены *hmg1*, *tms1*, *tmr1****

Природные изопреноидные соединения

Изопреноидами (терпеноидами) называют самый многочисленный класс природных соединений, углеродный скелет которых построен из разветвленных C₅-единиц, называемых изопреновыми единицами. Изопреноиды повсеместно распространены среди живых организмов, как эукариот, так и прокариот. Они объединяются в один класс по биогенетическому признаку, поскольку ведут свое начало из единого предшественника – изопентенилдифосфата (ИПДФ).

Без участия изопреноидов невозможны такие процессы как рост и развитие растений и животных, поскольку многие низко гормоны растений (гиббереллины, абсцизовая кислота, брассинолиды) и животных (стероидные, половые гормоны и гормоны коры надпочечников) относятся к этому классу соединений. Изопреноидные фрагменты входят в состав фотосинтетических пигментов (фитол, каротиноиды) и переносчиков электронов (пренильные боковые цепи убихинонов, пластохинона). Изопреноиды участвуют в биосинтезе полисахаридов (полипренилфосфаты), стабилизируют внутриклеточные мембраны (стерины у эукариот, фитоноиды и гопаноиды у бактерий). Однако большая часть известных к настоящему времени изопреноидов относится к веществам специализированного (вторичного) обмена растений, которые участвуют в процессах сигнализации, защиты от фитопатогенов. Многие антибиотики, фитоалексины, репелленты, токсины имеют изопреноидную структуру [1].

По-видимому, основная роль изопреноидов, специфичных для определенных семейств, родов и видов растений (это главным образом

моно-, сескви-, ди-, сестер- и тритерпеноиды), сводится к защите растений от различных неблагоприятных воздействий окружающей среды, в том числе от макро- и микровредителей [2].

Мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов.

Большая физиологическая роль изопреноидов, а также разнообразие их структур вызвали значительный интерес к изучению путей их биосинтеза.

В 1887 г. Валлах предложил основное “изопреновое правило”. Коротко суть его состоит в том, что многие природные соединения построены из изопреновых углеродных единиц и, следовательно, образуются, вероятно, путем полимеризации изопрена. Затем идеи, лежащие в основе этого правила, расширил Ружичка, сформулировав их как *биогенетическое изопреновое правило*. Он предположил, что все терпеноиды синтезируются из предшественника, названного “активным изопреном”. Это предположение нашло подтверждение, когда Линен идентифицировал это вещество как Δ^3 -изопентенилпирофосфат (ИППФ). В 1956 г. Фолкерс показал, что ключевым предшественником ИППФ является C_6 -гидроксикислота - (3R)-мевалоновая кислота [3].

Начиная с 1956 г., когда была открыта мевалоновая кислота, и показано ее включение в холестерин в гомогенатах печени крысы, утвердилось общее представление, что у всех живых организмов изопреноиды образуются на ранних стадиях по единому мевалонатному пути (путь Блоха-Линена) [4]. Этот путь, изученный *in vitro* на бесклеточных препаратах из печени и дрожжевых клетках, начинается с конденсации двух молекул ацетил-коэнзима А в ацетоацетил-КоА, который далее присоединяет еще одну молекулу ацетил-КоА с образованием ОМГК. Восстановление последнего с участием двух молекул НАДФН приводит к образованию МВК (β,δ -дигидрокси- β -метилвалериановой кислоты). МВК после фосфорилирования

по С-5 и последующего окислительного декарбоксилирования превращается в ИППФ – первый С₅-предшественник с разветвленным углеродным скелетом. ИППФ затем превращается во все известные природные терпены и терпеноиды.

Все ферменты, действующие на отдельных стадиях этого пути, были выделены и изучены на примере животных и растительных организмов [5]

Роль 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы в биосинтезе мевалоновой кислоты

В 1982 г. Бах и Лихтенталер, используя выделенный из *Aspergillus terreus* метаболит мевинолин, который избирательно ингибирует 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу, показали необходимость этого фермента для нормального роста и развития как отдельных органов, так и целого растения. Эффект ингибирования роста не обращался добавлением гибберелловой кислоты, однако пропадал при внесении мевалоната – продукта реакции, катализируемой 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазой [6,7,8].

3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктаза [EC 1.1.1.88] катализирует NADPH-зависимую реакцию превращения 3-окси-3-метилглутарил-КоА, образуемого путем конденсации молекул ацетил-КоА в мевалоновую кислоту (МВК). Этот фермент (ОМГКР) – ключевой, лимитирующий на данном этапе биосинтез изопреноидов. Практически у всех высших растений существуют множественные изоформы этого фермента, образующиеся как за счет множества кодирующих генов (семейства генов *hmg*), так и за счет альтернативного процессинга мРНК и посттрансляционной модификации [9]. Строение и топология ОМГР подробно изучена на примере *Arabidopsis thaliana* рядом авторов [10, 11].

Несмотря на большое количество изоформ белка ОМГР, практически все, известные на сегодняшний день формы, связываются с

микросомальным ЭПР и синтезируют мевалоновую кислоту в цитозоле. Ряд авторов объясняет это тем, что включение белка в ЭПР требует специфического взаимодействия сигнальной последовательности с различными компонентами транслокационной системы [12], а так как сама система эволюционно высоко консервативна, то выбор внутриклеточной мембраны также становится специфичным [13, 14, 15]. В то же время фермент способен связываться с мембранами хлоропластов: на это указывает присутствие и чрезвычайно высокая активность ОМГР в хлоропластах *Stevia rebaudiana*, относящейся к семейству *Compositae*, обнаруженная Кимом с соавторами [16]. В других растениях этого семейства подобной активности не наблюдалось. Уровень активности микросомального пула ферментов ОМГР у всех растений семейства был одинаков.

Гены, кодирующие 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу

В последнее десятилетие работы по изучению генов, кодирующих 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу, активно ведутся во многих лабораториях мира. Интерес исследователей вызван, прежде всего, важной ролью ОМГР в биосинтезе стероидов. За это время были изучены гены и/или последовательности кДНК, кодирующие ОМГР таких видов как арабидопсис [9], томаты [17], гевея [18], картофель [19]. Показано, что ОМГР в растениях кодируется небольшим мультигенным семейством, в то время как в геноме животных обнаружена единичная копия гена *hmg*. Различными авторами сделаны попытки понять механизмы регуляции экспрессии генов *hmg*.

Изучение растительных генов семейства *hmg* началось после работ двух групп исследователей [9, 20], которые независимо друг от друга в 1989 году клонировали ген *hmg1* из библиотеки кДНК *Arabidopsis thaliana*. Авторы приводят нуклеотидную последовательность этого гена. В обеих

работах отмечается высокая консервативность С-концевого домена фермента, содержащего каталитический сайт, и гомологичность таковому дрожжей, человека, сирийского хомячка и дрозофилы, в отличие от вариабельного N-концевого домена [9, 20].

Позднее было обнаружено наличие в *Arabidopsis thaliana* второго гена семейства *hmg* – *hmg2* [10]. Оба гена имеют сходное строение и состоят из четырех экзонов и трех небольших интронов. Кодирующие области генов сходны, однако 5'- и 3'-концевые участки значительно различаются. В экспрессии генов семейства также наблюдаются определенные различия. мРНК *hmg1* обнаружена во всех тканях растения, в то время как локализация мРНК *hmg2* ограничена проростками, корнями и соцветиями, то есть зонами активных меристем [10].

Использование *hmg1 Arabidopsis thaliana* в качестве зонда позволило клонировать и определить нуклеотидную последовательность генов семейства *hmg Solanum tuberosum* – *hmg1*, *hmg2*, *hmg3*. Показана различная картина экспрессии этих генов в ответ на поранение и инокуляцию различными расами фитифторы. Это позволило авторам сделать вывод о наличии двух независимых каналов для биосинтеза стероидов и сесквитерпенов в тканях картофеля [19].

Данные о гетерологичной экспрессии генов семейства *hmg* подтверждаются работами с гефеей [18]. Показано, что экспрессия гена *hmg3* не имеет тканевой специфичности, в то время как *hmg1* интенсивно экспрессируется в млечниках. Экспрессия *hmg1 Hevea brasiliensis* индуцируется этиленом, а *hmg3* конститутивно экспрессируется благодаря промотору, сходному с промоторами генов “домашнего хозяйства”. Таким образом, считают авторы, ген *hmg1* участвует в биосинтезе соединений, входящих в состав латекса, а *hmg3* в биосинтезе изопреноидов, необходимых для поддержания жизнедеятельности растения.

Позднее в работе Лернеда была продемонстрирована регуляция

экспрессии гена *hmg1* уровнем освещенности [21]. Автором было отмечено накопление большого количества мРНК *hmg1* в растениях *Arabidopsis thaliana*, культивируемых в темноте. При исследовании промотора гена *hmg1* путем создания конструкции *hmg1::uidA*, было показано, что в растениях, культивируемых на свету, сохранялся постоянный базовый уровень экспрессии гена. Однако при адаптации растений к условиям пониженной освещенности (после 24 часов культивирования в темноте) уровень экспрессии с промотора гена *hmg1* резко возрастал [22]. При этом наблюдалась обратная зависимость между уровнем экспрессии фьюжен-конструкции и возрастом органа. В молодых листьях уровень экспрессии нарастал более интенсивно и достигал более высоких значений, чем в старых, полностью сформировавшихся. В тканях корня не наблюдали зависимости уровня экспрессии гена от уровня освещенности. Авторами показано, что наблюдаемая реакция контролировалась на уровне транскрипции и опосредована элементами расположенными, в промоторе гена *hmg1*.

В контексте данного обзора наибольший интерес представляют работы, посвященные изучению совместной экспрессии нативного и интродуцированного генов в растениях. Введение активно транскрибируемого гена *hmg1* под контролем 35S промотора в растения *Arabidopsis thaliana* [23] проявлялось в эффективном (в 40 раз) увеличении уровня мРНК 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы, однако авторам удалось обнаружить лишь незначительное (в 2 раза) увеличение ферментативной активности. Авторами высказано предположение о сложной многоуровневой системе контроля экспрессии гена *hmg1* в высших растениях.

Результаты и обсуждение

Результаты экспрессии гетерологичного гена *hmg1* в трансгенных линиях *Nicotiana tabacum* L

Ранее в лаборатории биотехнологии растений УРАН ФИБХ (г. Пущино) были получены трансгенные растения табака с геном *hmg1* в прямой и обратной ориентациях относительно двойного вирусного промотора CaMV 35SS [24]. В дальнейших исследованиях использовали по три линии каждого варианта (A1, A2, A6, C1, C2, C4) трансгенных растений с геном *hmg1*, линии «трансгенного контроля» (pSS), полученные при трансформации «пустым» вектором, и контрольную нетрансгенную линию.

Содержание суммы стерин в тканях трансгенных линий табака

Поскольку стерин образуются в цитоплазме из мевалоновой кислоты, мы предположили, что в исследуемых линиях может происходить изменение их качественного и количественного состава. Для проверки данной гипотезы была проведена тонкослойная хроматография и спектрофотометрическое определение содержания суммы стерин в тканях исследуемых растений.

С помощью тонкослойной хроматографии показано, что отличий в качественном составе стерин в разных линиях растений, а так же в их разных частях не наблюдается.

Определение содержания стерин (компонентов, реагирующих с реактивом Бурхартда-Либермана) в неомыляемом остатке показало, что их количество в корнях растений после цветения у разных линий не отличается. Анализ суммы стерин в семенах показал, что семена всех смысловых линий с геном *hmg1* содержат их на 40-50% больше, чем контрольные. Уровень стерин в семенах антисмысловых линий не отличался от контроля. Результаты представлены в наших публикациях [25].

Исследование уровня стерина в тканях листа показало, что их содержание зависело от возраста растений и достигало максимума в зрелых тканях, что согласуется с литературными данными [26]. До цветения в листьях смысловых линий и контрольных растениях наблюдали одинаковое количество стерина, тогда как в антисмысловых – на 10-15% меньше. В начале массового цветения растений уровень стерина в листьях антисмысловых линиях достигал контрольного, а в смысловых начинал превосходить контрольный уровень на 50% (рис. 1).

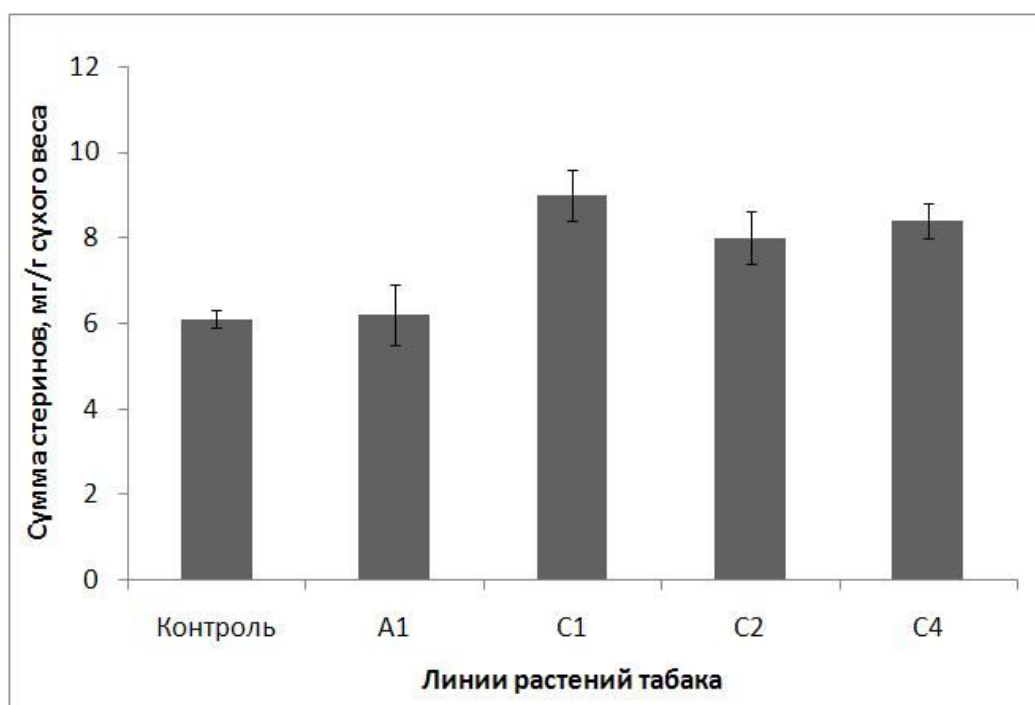


Рисунок.1 - Содержание стерина в тканях листа до цветения растений

Изменения в структуре мезофилла листа трансгенных растений

Растения являются автотрофными организмами, структура которых приспособлена к оптимальному выполнению функции фотосинтеза на всех уровнях организации. На внутреннее строение фототрофных тканей может повлиять множество факторов, в том числе фитогормоны, факторы роста и

т.д. Стерины являются продуктами основного, а не вторичного метаболизма растений и образуются в цитоплазме из мевалоновой кислоты, мы предположили, что экспрессия гетерологичного гена *hmg1* приведёт к изменению количества стерина в мембранах клеток. Кроме того, возможно изменение эндогенного уровня цитокининов и брассинотероидов, что должно оказать влияние на структуру мезофилла листа. Изменение в анатомии листа, в свою очередь, может приводить к изменениям в интенсивности фотосинтеза, дыхания, транспирации растения, водоёмкости листа и его устойчивости к фитопатогенам.

Для изучения параметров мезоструктуры листа были приготовлены поперечные срезы из центральной части листовой пластинки, исключая крупные жилки. Микроскопические исследования показали, что соотношение количества губчатых и столбчатых клеток мезофилла мало отличается у разных трансгенных линий между собой и в сравнении с контролем и близко к 1:1. Было отмечено, что лист табака очень рыхлый, содержит множество межклетников, клетки губчатого и столбчатого мезофилла по форме отличаются мало.

Измерение толщины листа показало, что все линии трансгенных растений имеют немного меньшую толщину листа по сравнению с контролем, кроме линии С1. Отличия составили чуть более 12%, но были достоверны (рис. 2).

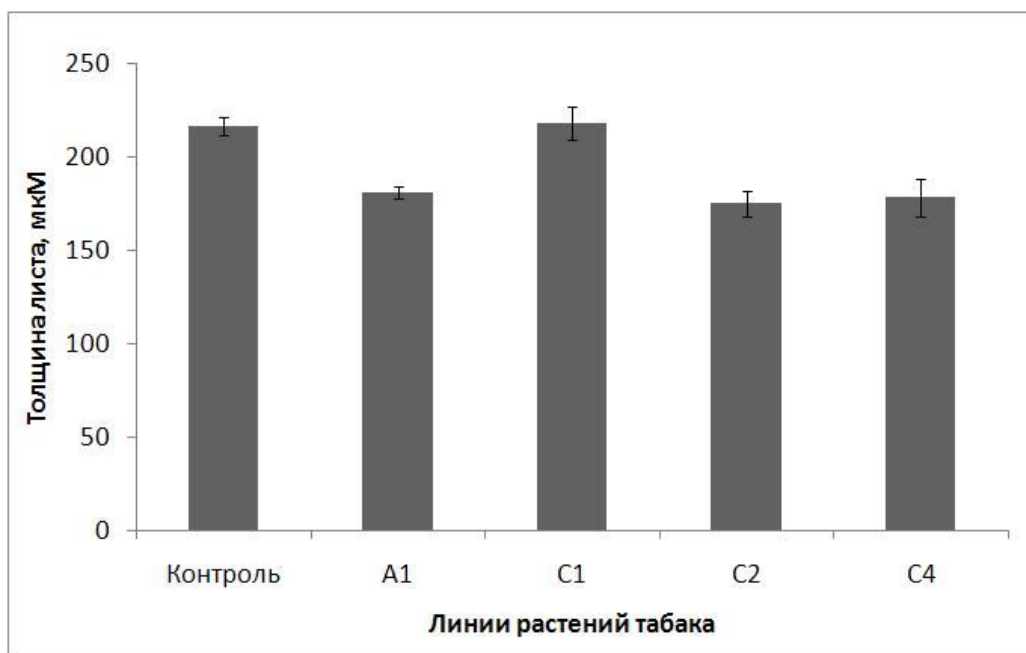


Рисунок 2 - Толщина листа трансгенных линий.

Подсчёт числа мезофильных клеток в тканевом мацерате показал, что антисмысловые линии имеют большее число клеток в единице площади листа, смысловые – сколько и контрольные, кроме линии C1 (рис. 3). Линия C1 возможно, отличается меньшим уровнем экспрессии гетерологичного гена *hmg1* (рис. 3) Измерение размеров клеток листа показало, что смысловые линии имеют больший объём клеток губчатого мезофилла в сравнении с контрольной и антисмысловыми линиями. При этом объём клеток столбчатой паренхимы в линиях достоверно не отличался. В контрольном варианте и у линии A1 объём клеток губчатого и столбчатого мезофилла был практически одинаков, в то время как у других линий объём клеток губки был больше объёма клеток палисада (рис.4).

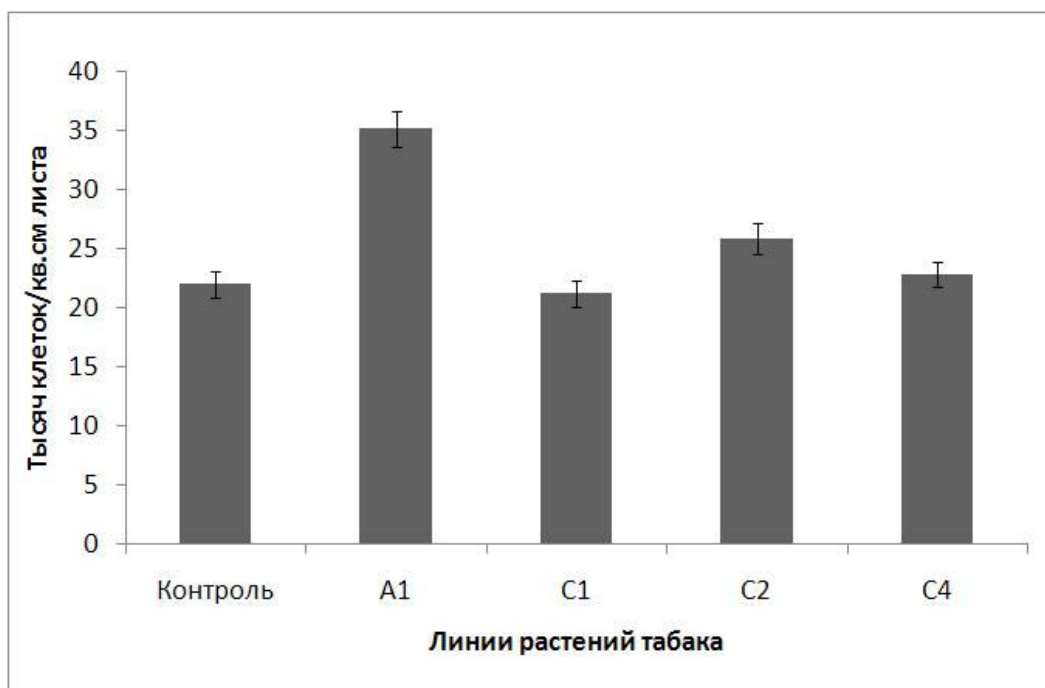


Рисунок 3 - Количество клеток мезофилла в единице площади листа.

Такие различия в объеме клеток и их числе в единице поверхности листа позволили предположить, что плотность упаковки клеток в листьях трансгенных линий больше, чем в контроле. Это могло быть обусловлено разными факторами. Для антисмысловых линий большая плотность упаковки объясняется уменьшением толщины листа и увеличением количества мезофильных клеток, а для смысловых линий - увеличением объёма клеток, особенно губчатого мезофилла, при уменьшении толщины листа.

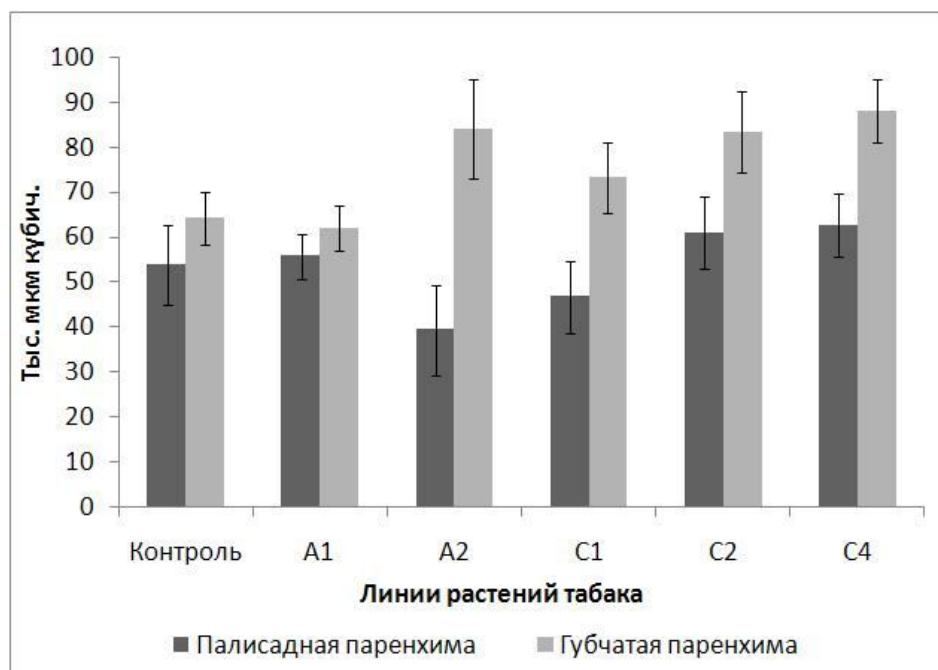


Рисунок 4 - Объем клеток мезофилла.

Данные по расчёту доли мезофилла в общем объёме листа и индекса мембран клеток представлены в таблице (табл. 1). Наше предположение, о более плотной упаковке клеток в мезофилле трансгенов, подтвердилось для всех вариантов, за исключением линии C1, которая отличалась несколько более рыхлыми листьями, чем другие линии. Однако наблюдаемые различия для линии C1 и контроля были недостоверны.

Таблица 1 - Расчётные показатели мезоструктуры листа

Линия	Индекс мембран клеток	Доля мезофилла в объёме листа
Контроль	1.9	0.30
A1	3.0	0.46
C1	1.9	0.25
C2	2.5	0.40
C4	2.3	0.51

Таким образом, у трансгенных растений мы наблюдали увеличение внутренней ассимиляционной поверхности листа (ИМК) и доли мезофилла в нем. Эти два признака могут оказывать влияние на скорость диффузии газов в листе и, следовательно, скорость фотосинтеза, дыхания, транспирацию.

При определении количества устьиц на нижнем эпидермисе листа отличий между вариантами обнаружено не было. Наблюдаемые изменения мезоструктуры листа не повлияли на водоёмкость листа, интенсивность фотосинтеза, дыхания и транспирации растений [27].

Устойчивость растений к стрессовым факторам

Известно, что изменение содержания стероидов в растениях может оказывать влияние на их устойчивость к биотическим стрессам, на чувствительность растений к фитогормонам [2]. Кроме того, на устойчивость растений к стрессам влияет уровень таких фитогормонов, как цитокинины и брассиностероиды. Все эти соединения синтезируются в клетке из мевалоновой кислоты. Изменение уровня данных фитогормонов может влиять на анатомию листа растений, что тоже сказывается на их чувствительности к стрессам.

Сесквитерпены также образуются в цитоплазме из мевалоновой кислоты. Некоторые из этих веществ являются фитоалексинами и повышают устойчивость растений к фитопатогенам. Кроме того, сесквитерпены содержат несколько двойных связей, часто сопряженных, поэтому они могут участвовать в тушении активных форм кислорода и тем самым повышать устойчивость растений и к абиотическим стрессорам.

Устойчивость к фитопатогенам

Как известно, некоторые сесквитерпены являются фитоалексинами. Поэтому растения с усиленным ацетатно-мевалонатным биосинтетическим

путём могут быть более устойчивы к фитопатогенам. Ряд микроорганизмов, обладающих узким спектром хозяев, являются ауксотрофными по биосинтезу стероидов и в отсутствии экзогенных фитостероидов значительно замедляют свой рост и теряют способность к половому размножению. Поэтому растения с антисмысловой копией гена *hmg1* могут приобрести устойчивость к некоторым фитопатогенам, например представители семейства *Solanaceae* – к *Phytophthora infestans*.

Мы оценивали устойчивость растений к фитопатогену широкого круга хозяев *Pseudomonas syringae*, предполагая, что растения с антисмысловой копией гена *hmg1* будут более восприимчивы к нему, а со смысловой – более устойчивы.

Показатели стресса оценивали по увеличению уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), увеличению содержания эндогенной перекиси водорода и уровню свободного пролина, а также по изменению активности СОД и гваяколовой пероксидазы.

По всем исследованным маркерам стресса линии с антисмысловой копией гена в сравнении с контролем не показали достоверных отличий в устойчивости к патогенам. Это может быть связано с недостаточным ингибированием ацетатно-мевалонатного биосинтетического пути у растений при использовании стратегии антисмысловых РНК.

Смысловые линии не показали увеличения содержания продуктов ПОЛ после стресса, тогда как в контроле рост составил более 70%. Это свидетельствует о том, что трансгенные линии не испытывают значительного стресса в отличие от контроля (рис. 5).

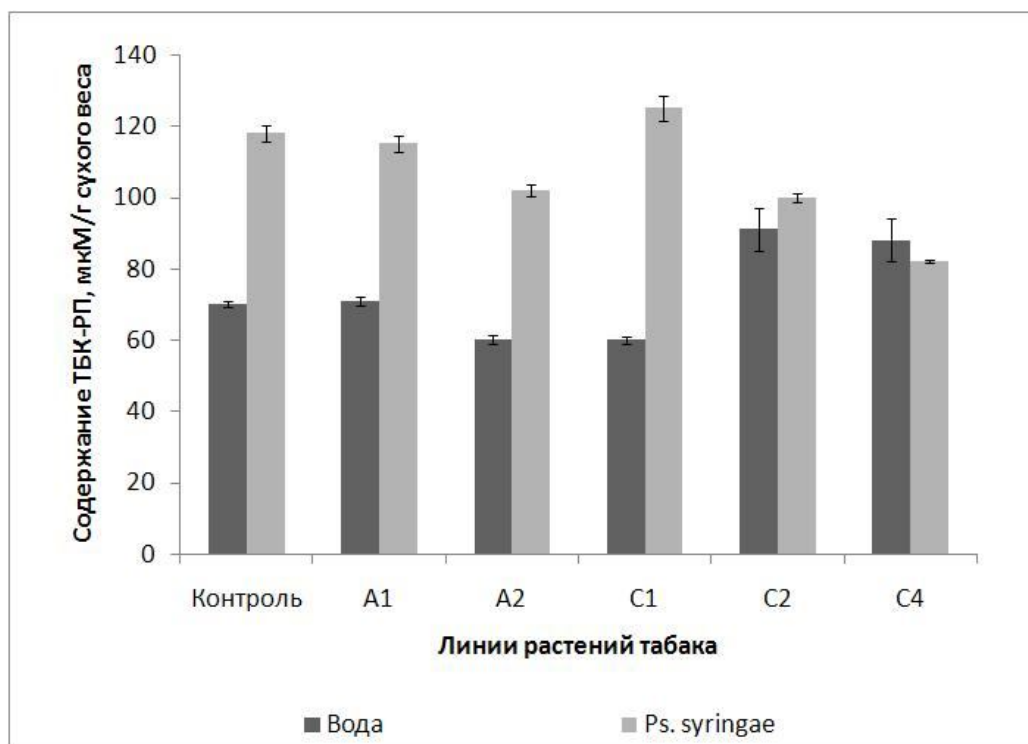


Рисунок 5 - Уровень ПОЛ при экспонировании растений табака на воде или при обработке фитопатогенном *Pseudomonas syringae*.

Под действием патогена *Ps. syringae* в контроле происходил незначительный рост уровня свободного пролина, при этом в смысловых линиях наблюдали его увеличение более, чем в 3 раза (рис. 6). Рядом исследователей показано, что растения с большим уровнем пролина обладают большей устойчивостью к стрессорам [28]. На растениях томата показано, что заражение листьев вирулентными штаммами *Ps. syringae* не вызывает изменения уровня пролина, тогда как авирулентные штаммы *Ps. syringae* приводят к накоплению эндогенного пролина. Таким образом, возрастание уровня пролина в трансгенных растениях со смысловой формой гена *hmg1* свидетельствует о повышении их устойчивости к биотическому стрессу.

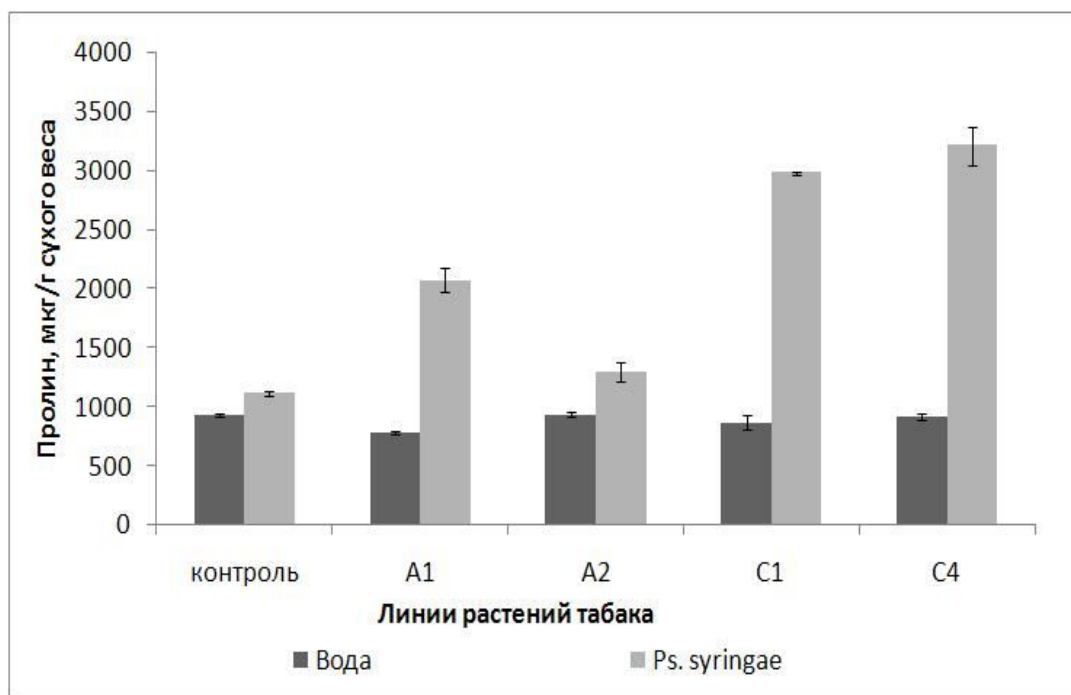


Рисунок 6 - Содержание свободного пролина в тканях контрольных и трансгенных растений табака в норме и при биотическом стрессе *Pseudomonas syringae*.

Для понимания механизмов устойчивости трансгенных растений с геном *hmg1* к этому фитопатогену провели оценку активности супероксиддисмутазы. Активность СОД у трансгенных растений при биотическом стрессе возрастала сильнее, чем в контроле, что свидетельствует о большей нейтрализации супероксида в трансгенных линиях табака.

Таким образом, изучение антиоксидантного статуса растений показало, что линия C1 была менее устойчива к биотическому стрессу, что может быть связано с низкой экспрессией трансгена в этой линии. Линия C1 значительно отличалась от других линий со смысловой конструкцией и по показателям мезоструктуры листа.

Как было показано выше, ткани листа трансгенных линий, независимо от встроенной генетической конструкции с геном *hmg1*, имеют более плотную упаковку мезофилла в объеме листа, что может как способствовать,

так и препятствовать распространению биотрофных фитопатогенов в растении, в зависимости от особенностей вторичного обмена. Однако смысловые и антисмысловые линии имеют разный уровень вторичных метаболитов. Проведя корреляционный анализ, мы выяснили, что устойчивость к фитопатогену у линий со смысловой копией гена имеет сильную обратную корреляцию с плотностью упаковки клеток в объёме листа ($r=-0,9$), тогда как для антисмысловых линий такой зависимости не показано ($r=-0,3$).

Таким образом, показана специфичность реакций растений с разными формами гена *hmg1* на биотический стресс и увеличение устойчивости трансгенных линий со смысловой копией гена к фитопатогену *Ps. syringae* с широким спектром хозяев.

Аналогичные результаты получены нами при заражении листовых дисков табака некротрофным фитопатогенном *Ervinia carotovora* (рис. 7).

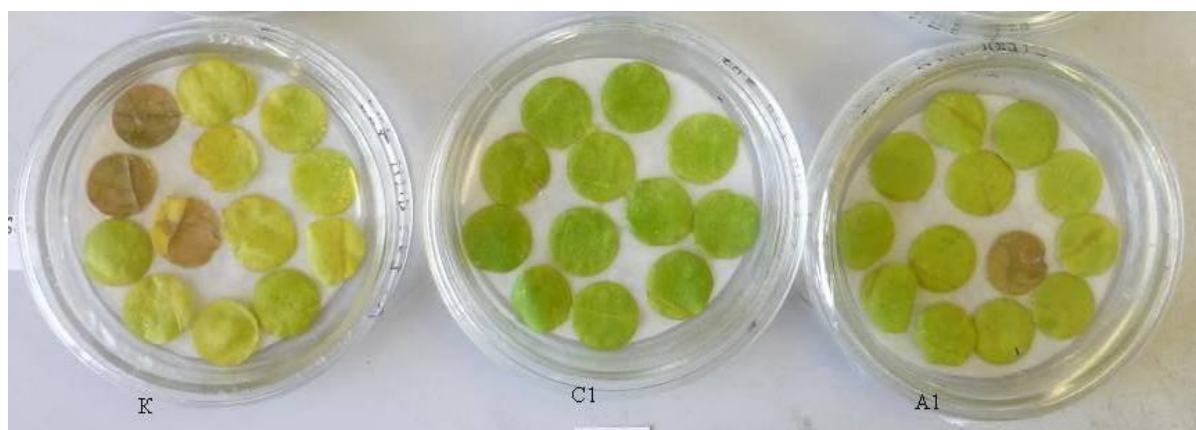


Рисунок 7 - Заражение листовых дисков табака фитопатогенном *Ervinia carotovora* в течение 7 суток. Контрольные растения (К) имеют высокую степень некроза, у растений с пониженной экспрессией гена *hmg1* (А1) заметно начало некроза и хлороз, тогда как растения с повышенной экспрессией изучаемого гена (С1) остаются здоровыми.

Реакция трансгенов табака на окислительный стресс, вызванный паракватом

Поскольку сесквитерпены могут выполнять роль не только фитоалексинов, но и антиоксидантов, представляло интерес выяснить реакцию трансгенных линий на окислительный стресс, вызванный паракватом.

Как и в случае с биотическим стрессом, растения с антисмысловой формой гена *hmg1* не показали снижения устойчивости к этому стрессу в сравнении с контролем. Растения со смысловой формой гена обнаружили большую устойчивость к абиотическому стрессу. Это подтверждается меньшей степенью перекисного окисления мембран клетки. Под действием гербицида в контроле и в антисмысловых линиях происходил рост содержания продуктов ПОЛ, тогда как в смысловых линиях под действием параквата степень ПОЛ оставалась прежней или даже снижалась (рис. 8).

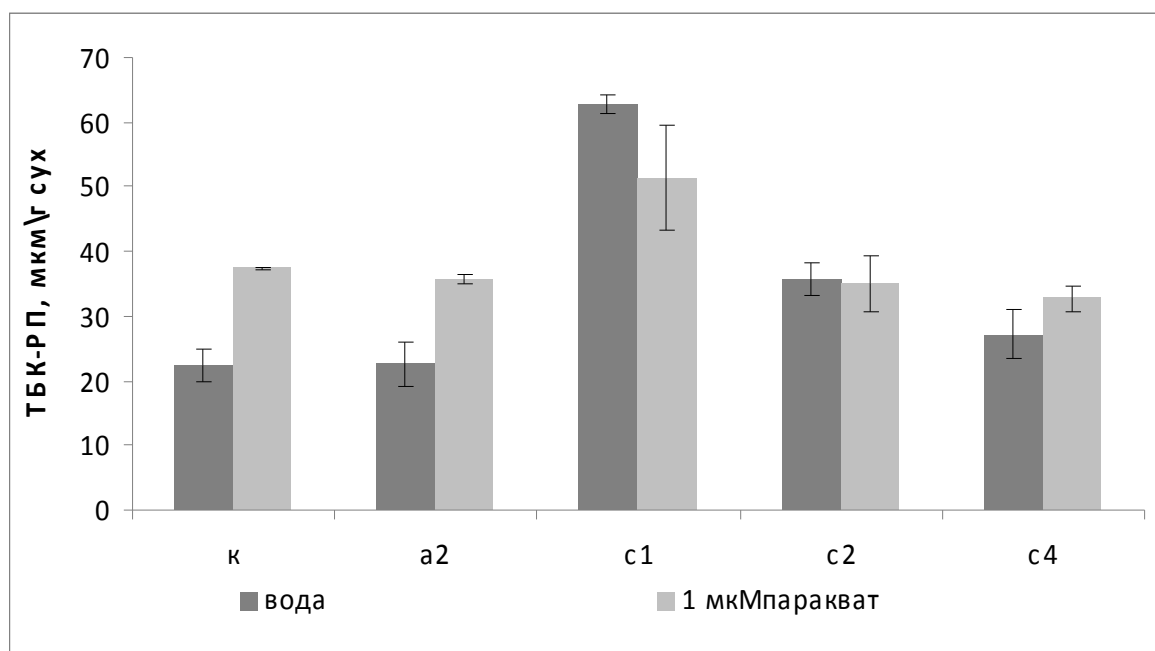


Рисунок 8 - Уровень ПОЛ в листьях контрольных и трансгенных растений табака с геном *hmg1* под действием параквата.

Содержание пролина существенно не изменялось под действием

окислительного стресса, вызванного паракватом. При этом в контроле и в антисмысловой линии происходило ингибирование активности гваяколовой пероксидазы, что может свидетельствовать о высоком уровне стресса, с которым растение не справляется, тогда, как в смысловых линиях активность фермента сохранялась, что говорит об эффективной утилизации АФК (рис. 9).

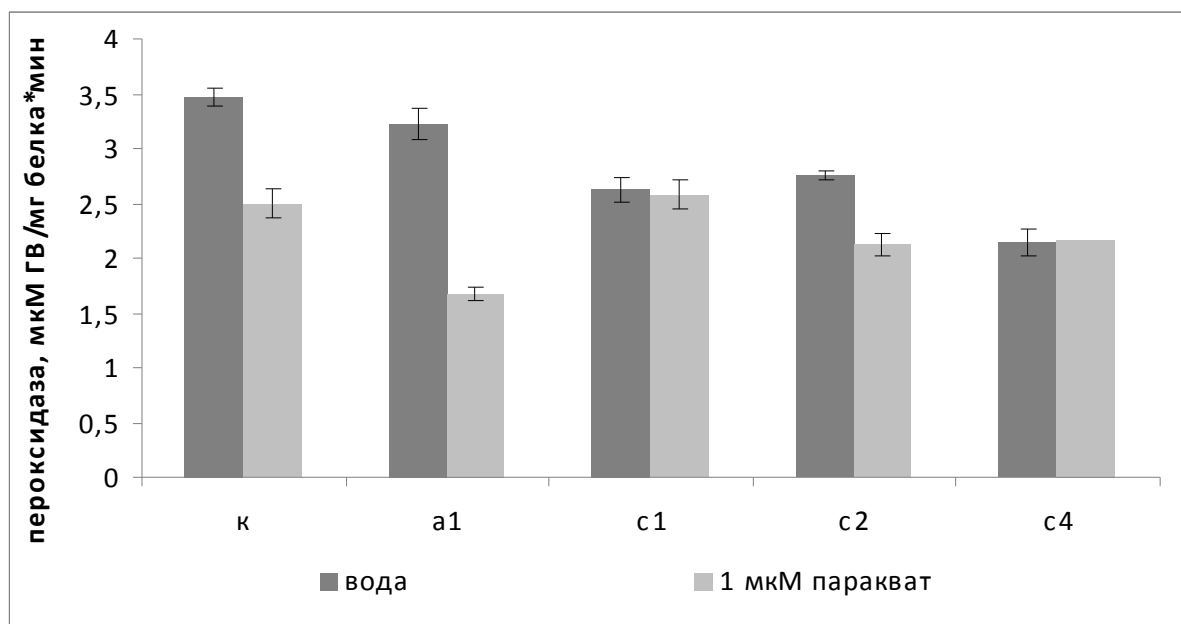


Рисунок 9 - Активность пероксидазы в листьях растений табака в ответ на действие параквата.

Роль модифицированной экспрессии гена *hmg1* в устойчивости пигментного комплекса трансгенных растений табака к действию ионов меди

Медь — важный микроэлемент, необходимый для нормальной жизнедеятельности растений и функционирования цепи электронного транспорта. Вместе с тем, это тяжелый металл с переменной валентностью, в высоких дозах токсичный для клеток [29]. Загрязнение окружающей среды соединениями меди в настоящее время является серьезной проблемой для многих промышленных территорий. Избыток соединений меди приводит к несбалансированному образованию АФК и окислительному стрессу

растений. В предыдущих исследованиях нами показано, что трансгенные растения табака со смысловой формой встроенного гена *hmg1* обладали повышенным уровнем антиоксидантной активности при действии абиотического стресса, вызванного ионами меди [27].

Исследование проводили на трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун, содержащих гетерологичный ген *hmg1* из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn., в прямой (смысловые формы) и обратной (антисмысловые формы) ориентациях относительно конститутивного вирусного промотора CaMV 35SS [24]. В работе использовали три линии растений со смысловой формой гена *hmg1* (C1, C2, C4), две линии с антисмысловой формой, в которых для ингибирования гена *hmg1* применена стратегия антисмысловых РНК (A1 и A2), и контрольную линию табака (К). Растения размножали в асептических условиях на среде МС в термостатной комнате при фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) и температуре 25°C. В возрасте один месяц растения пересаживали в закрытый грунт в горшки объемом 7 л. Исследование выполняли на высечках ($d=5$ мм) листьев среднего яруса растений табака, растущих два месяца в условиях теплицы. Листовые диски инкубировали на поверхности раствора сульфата меди (100 мкМ) или дистиллированной воды в течение 20 ч.

Фотосинтетические пигменты извлекали из гомогенизированных тканей листа холодным 80%-ным ацетоном в присутствии CaCO_3 . Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов определяли на спектрофотометре «Arel» UV-303 (США), рассчитывая по оптической плотности при 665, 649 и 470 нм по стандартным формулам [30].

Для работы использовали усредненную пробу, полученную из 8-12 листьев, отобранных с 3-4 растений одного возраста. Экстракцию проводили в трех повторностях. На рисунках и в таблице результаты представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Достоверность отличий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 6.0 или MS Excel 2007.

Листовые высежки всех линий после воздействия стрессора фенотипически не отличались между собой, а также от варианта, инкубированного на поверхности воды (не было признаков некроза или хлороза). Анализ состояния фотосинтетических пигментов показал, что растения трансгенных линий и контрольные растения по-разному реагируют на действие ионов меди. При этом реакция трансгенных линий табака зависела от ориентации встроенного гена *hmg1* относительно промотора.

Известно, что медь является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов, оказывающих отрицательное воздействие на пигментный комплекс высших растений даже при небольших концентрациях [31]. В наших опытах ионы меди негативно влияли на пигментные системы контрольных растений, что заключалось в деструкции хлорофиллов (снижение на 8%) и каротиноидов (уменьшение на 14%), по сравнению с эксплантами, инкубированными на поверхности воды (рис. 10 а, б).

В трансгенных растениях с подавлением экспрессии гена *hmg1* (линии A1 и A2) наблюдали более заметные повреждения пигментного комплекса – деструкция хлорофиллов составляла 11-20%, а каротиноидов – 16-28%.

В смысловых формах растений с повышенным синтезом мевалоната (линии C1, C2, C4) негативное воздействие ионов меди на пигментные комплексы хлоропластов было снижено. Содержание хлорофиллов при стрессе увеличивалось на 5-16%, в сравнении с вариантом, инкубированным на воде, тогда как количество каротиноидов снижалось на 7% в линии C1 или повышалось на 7-17% в линиях C2 и C4, соответственно (рис. 10 а, б).

Таким образом, обнаружен положительный эффект повышенной экспрессии гена *hmg1* на устойчивость пигментного комплекса к окислительному стрессу, вызванному ионами меди. В листьях трансгенных растений табака со смысловой формой гена *hmg1* негативное влияние ионов

меди было выражено в меньшей степени и даже наблюдали стимулирование биосинтеза пигментов. Подавление экспрессии данного гена приводило к более сильной деструкции фотосинтетических пигментов в трансгенных линиях, чем в контроле.

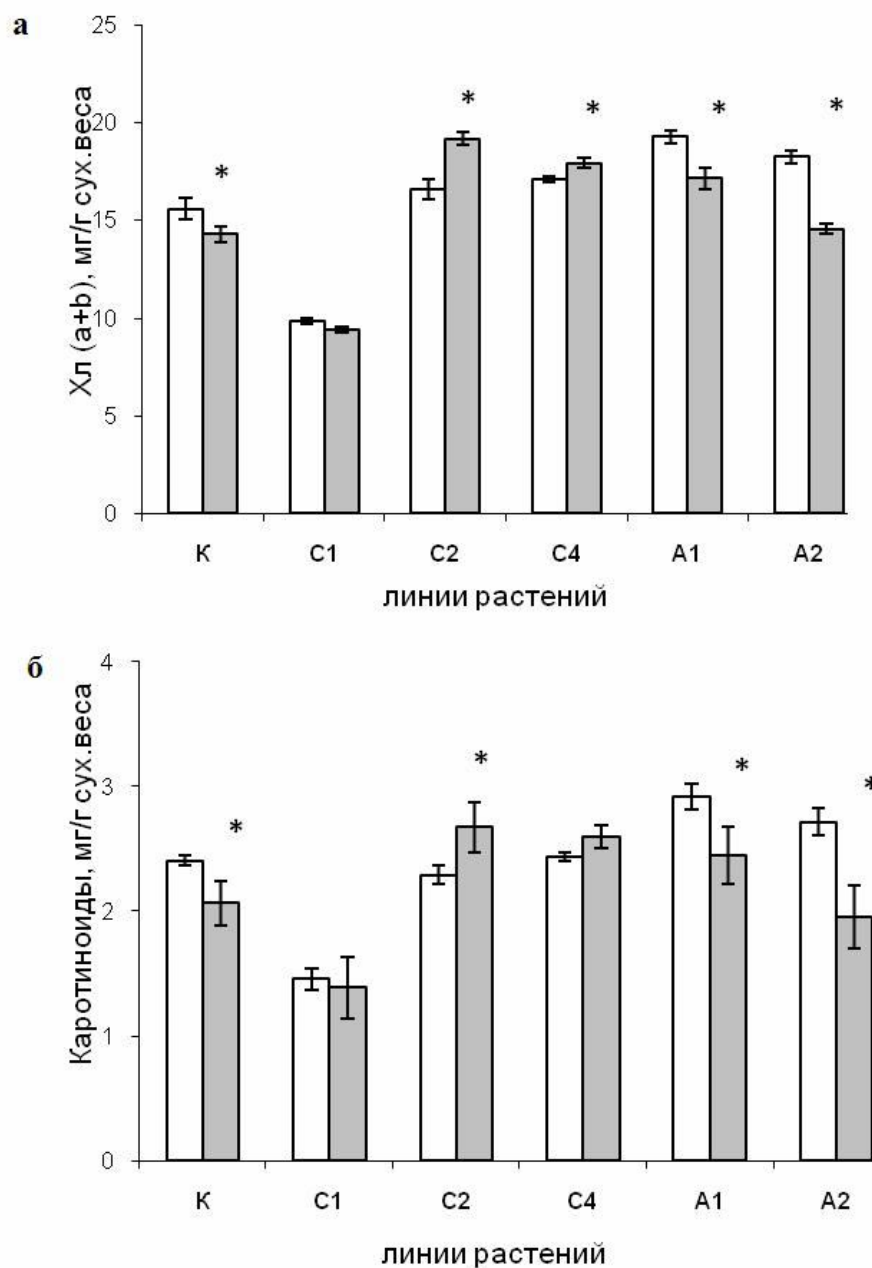


Рисунок 10 - Содержание фотосинтетических пигментов в листьях трансгенных растений табака при инкубации на воде (белый цвет) и после обработки 100 мкМ сульфатом меди в течение 20 ч (серый цвет). а – содержание суммы хлорофиллов (a+b); б – содержание каротиноидов.

* - Различия между вариантами на воде и на сульфате меди достоверны при $p < 0,05$.

Важным показателем устойчивости пигментного комплекса к стрессу является не только содержание пигментов в тканях листа, но и их соотношение. Например, для хлорофиллов, отношение a/b достаточно постоянно и составляет 2,0-2,5 [30]. Изменение данного параметра может свидетельствовать о нарушении в работе фотосистем I и II (ФС I и II). Для листьев всех линий исследованных растений этот показатель в нормальных условиях (на воде) достоверно не менялся (таблица 2). При стрессе соотношение хлорофиллов a/b в контроле и в линиях C1, C2, C4 так же достоверно не менялось и составляло 2,1-2,16. Между тем, в линиях A1 и A2 этот показатель достоверно снижался, что может свидетельствовать о негативном влиянии подавления синтеза мевалоната на работу ФС I и ФС II под действием ионов меди.

Таблица 2 - Соотношение фотосинтетических пигментов в листьях трансгенных растений табака

Линия	Хлорофилл a/b		Хлорофиллы/каротиноиды	
	вода	100 мкМ CuSO ₄	вода	100 мкМ CuSO ₄
Контроль	2,20 ± 0,08	2,16 ± 0,07	6,46 ± 0,18	6,92 ± 0,21
A1	2,11 ± 0,02	1,96 ± 0,06*	6,61 ± 0,18	7,00 ± 0,29
A2	2,03 ± 0,04	1,93 ± 0,09*	6,72 ± 0,15	7,45 ± 0,26
C1	2,11 ± 0,11	2,11 ± 0,06	6,78 ± 0,29	6,77 ± 0,14
C2	2,18 ± 0,08	2,11 ± 0,02	7,22 ± 0,05	7,16 ± 0,04
C4	2,10 ± 0,03	2,09 ± 0,05	7,01 ± 0,08	6,90 ± 0,12

* - Различия между вариантами на воде и на сульфате меди достоверны при $p < 0,05$.

Известно, что соотношение фотосинтетических пигментов – хлорофиллов и каротиноидов так же является достаточно стабильным показателем. Под действием ионов меди в контрольных растениях произошло незначительное увеличение данного индекса (с 6,46 до 6,92). Отношение хлорофиллов к каротиноидам для линий со смысловой формой гена *hmg1* не изменилось (таблица 2). В линиях растений с подавленным синтезом мевалоната увеличение этого параметра было более сильным (в среднем на 9%). Эти данные могут свидетельствовать о том, что линии A1, A2, а также контроль подвергались более сильному стрессу, чем линии C1, C2, C4 (таблица 2). В контрольной и антисмысловых линиях растений деструкция каротиноидов происходила значительно сильнее, чем хлорофиллов, что может указывать на их расходование в качестве антиоксидантов для тушения АФК, образующихся в ответ на действие ионов меди.

Протекторное действие экспрессии гена *hmg1* в трансгенных растениях табака со смысловой формой гена может быть связано с увеличением «жесткости» мембран за счёт возрастания в них уровня стерина, что обнаружено нами ранее [24, 25]. При воздействии на эти растения гербицида параквата происходило увеличение в них синтеза сесквитерпенов, что также является ответной реакцией на окислительный стресс (Орлова И.В., неопубликованные данные). Важным фактором устойчивости растений табака со смысловой копией гена *hmg1* служит их повышенный антиоксидантный статус в условиях стресса, что выявлено нами ранее [27]. Кроме того, можно предположить, что в этих растениях увеличилось содержание фитогормонов изопреноидной природы, а именно брассиностероидов и цитокининов, обладающих иммуномодулирующим и стрессопротекторным действием [32, 33]. Изменение содержания стерина в мембранах клеток таких растений также могло привести к модификации их чувствительности к действию гормонов [2].

Заключение

Материалы исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Экспрессия гетерологичного гена *hmg1* влияет на организацию фототрофных тканей листа табака: упаковка клеток мезофилла в листе всех трансгенных линий более плотная, чем у контрольных растений. У смысловых растений большая плотность мезофилла достигается за счёт увеличения объёма клеток губчатой ткани, у антисмысловых – за счёт роста числа клеток и уменьшения толщины листа.

2. Растения табака со смысловой копией гена *hmg1* обладают большей устойчивостью к действию стрессов биотической (фитопатогены) и абиотической (гербицид паракват) природы, чем контрольные растения, что подтверждается более низким уровнем ПОЛ и увеличением содержания свободного пролина. Антисмысловые линии по устойчивости к патогенам не отличаются от контроля, что может быть связано со слабым ингибированием экспрессии гена *hmg1* при использовании стратегии антисмысловых РНК.

3. Показано, что обработка листовых высечек раствором сульфата меди (100 мкМ) в течение 20 ч негативно сказывалась на пигментном комплексе контрольных листьев табака. Происходила деструкция хлорофиллов и снижение содержания каротиноидов. При использовании стратегии антисмысловых РНК происходило подавление экспрессии гена *hmg1* и снижение синтеза мевалоната в клетках трансгенных линий табака A1 и A2. Это привело к более заметным изменениям пигментного комплекса при стрессе – большей деструкции хлорофиллов и каротиноидов, изменению соотношений хлорофиллов *a/b* и хлорофиллы/каротиноиды. Усиление биосинтеза мевалоната за счёт введения дополнительной копии гетерологичного гена *hmg1* под контролем сильного вирусного промотора в смысловых линиях растений снижало негативное действие ионов меди на пигментный комплекс, а

также стимулировало биосинтез пигментов.

4. Трансгенные растения не отличались от контрольных по качественному составу стеринам, но отличались по их количеству. Листья смысловых линий до цветения содержали в 1,5 раза больше стеринам, чем контрольные и антисмысловые, а семена – на 50%. Во время цветения количество стеринам в листьях смысловых и контрольных растений не отличалось, а у антисмысловых снижалось на 20%. В корнях содержание стеринам не отличалось у всех форм.

Список литературы

1. Harborne J. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids (Harborne, J., and Thomas-Barberan, F., eds). Clarendon Press, Oxford, 1991. P. 399-426.
2. Пасешниченко В.А. Терпеноиды и стероиды в жизни растений // Успехи биол. химии. 1991. Т. 32. С. 197-221.
3. Goodwin T., Mercer E. Regulation of sterol and carotenoid metabolism in germinating seedlings // Biochem. Soc. Symp., 1963. V. 24. P. 37-41.
4. Lichtenthaler H., Schwender J., Disch A., Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plants chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway // FEBS Lett. 1997. V. 400. P. 271-274.
5. Spurgeon S., Porter J. Biosynthesis of isoprenoid compounds. John Wiley and Sons, New York. 1981. P. 1-46.
6. Bach T., Lichtenthaler H.K. Inhibition by mevinolin of mevalonate formation and plant root elongation // Naturwissen. 1982. V. 69. P. 242.
7. Bach T., Lichtenthaler H.K. Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation // Physiol. Plant. 1983. V. 59. P. 50-60.
8. Bach T., Lichtenthaler H. Mechanisms of inhibition by mevinolin of microsome-bound radish and of partially purified yeast HMG-CoA reductase (EC.1. 1.1.34) // Z. Naturforsch. 1983. V. 38. P. 212-219.
9. Learned R.M., Fink G.R. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from Arabidopsis thaliana is structurally distinct from the yeast and animal enzymes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2779-2783.
10. Enjuto M., Balsells L., Campos N., Caelles C., Arro M., Boronat A. Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A reductase genes, wich encode microsomal forms of the enzyme // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 927-931.
11. Campos N., Boronat A. Targeting and topology in the membrane of plant 3- hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase // The Plant Cell. 1995. V. 7. P. 2163-2174.
12. Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahm H. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis // J. Amer. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 2564-2568.

13. Pestka S., Daugherty B.L., Jung V., Hotta K., Pestka R.K. Anti-mRNA: specific inhibition of translation of single mRNA molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 7525-7528
14. Wentzinger L.F., Bach T.J., Hartmann M-A. Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // *Plant Physiol*. 2002. Vol. 130. P. 334–346.
15. Suzuki M., Kamide Y., Nagata N., et.al. Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels // *Plant J*. 2004. Vol. 37. P. 750–761.
16. Keun K.K., Yamashita H., Sawa Y., Shibata H. A high activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in chloroplasts of *Stevia rebaudiana* Bertoni // *Biosci. Biotech. Biochem*. 1996. V. 60. P. 685-686.
17. Denbow C.J., Lang C.L., Cramer C.L. The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductases. Sequence, microsomal targeting, and glucosylation // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 9710-9715.
18. Chye M.L., Tan C.T., Chua N.H. Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: hmg1 and hmg3 are differentially expressed // *Plant Mol. Biol*. 1992. V.19. P. 473-484.
19. Choi D., Ward B.L., Bostock R.M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid // *Plant Cell*. 1992. V. 4. P. 1333-1344.
20. Chance B., Maehly A.C. Assays catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. N.Y.: Academic Press, 1955. P. 764–775
21. Learned R.M. Light suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol*. 1996. V. 110. P. 645-655.
22. Lerner R.M., Connolly E.L. Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 1997. V. 11. P. 499-511.
23. Re E.B., Jones D., Learned R.M. Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG-CoA reductase expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 1995. V. 7. P. 771-784.
24. Поройко В.А., Рукавцова Е.Б., Орлова И.В., Бурьянов Я.И. Фенотипические изменения трансгенных растений табака с антисмысловой формой гена hmg1 // *Генетика*. 2000. Т. 36. С. 1200–1205.

25. Ермошин А.А., Синенко О.С., Алексеева В.В. и др. Исследование влияния гетерологичного гена *hmg1* на мезоструктуру листа и устойчивость трансгенных растений табака к *Pseudomonas syringae* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2011. № 2 (14). С. 46-55.
26. Лутова Л.А., Шумилина Г.М. Метаболиты растений и их роль в устойчивости к фитопатогенам // Экологическая генетика. Т. 1. № 10. 2003. С. 47-58.
27. Ермошин А.А., Синенко О.С., Алексеева В.В., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И. Влияние экспрессии гена *hmg1* на физиолого-биохимические характеристики трансгенных растений. // Труды томского университета. Серия биологическая, 2010. Т. 275. С. 346 – 348.
28. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 2. С. 321-336.
29. P. Malec. Copper toxicity in leaves of *Elodea canadensis* Michx. // Bull. Environ. Contamination a. Toxicology. 2009. V. 82. P. 627-632.
30. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 256 с.
31. Малева М.Г., Некрасова Г.Ф., Безель В.С. Реакция гидрофитов на загрязнение среды тяжелыми металлами // Экология. 2004. № 4. С. 266-272.
32. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
33. Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Ann. Bot. 2000. V. 86, N 3. P. 441-447.

Апробация результатов исследований на научных конференциях

Результаты исследований доложены на двух конференциях:

1. IV Международная конференция "Горные экосистемы и их компоненты", Сухуми, Абхазия (10-14 сентября 2012) – 1 доклад (Кутлунина Н.А.)
2. II Всероссийская с международным участием школа-конференция "Биология будущего: традиции и новации", Екатеринбург (1-5 октября 2012 г.) – 3 доклада (Пермяковой М.В., Ермошина А.А. и Кондраткова П.В.)

Организация стажировок молодых участников проекта в ведущих научных центрах России и зарубежных стран

Организованы стажировки молодого ученого, аспиранта А.А. Ермошина:

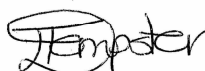
- 1) в г. Зальцбург, Австрия, SEB. Сертификат прилагается;
- 2) в г. Пущино, ФИБХ РАН. Сертификат прилагается

Certificate of Attendance

This is to certify that

.....*Alexander Ermoshin*.....

attended our Annual Main Meeting 2012,
28th June – 4th July in Salzburg, Austria



Talja Dempster
Society for Experimental Biology
Conference and Communications Manager

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИБХ РАН
 ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
 ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. академиков М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА
 РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
 (ФИБХ РАН)
 142290, г.Пушино, Московская область, проспект Науки, 6
 Телефон: +7 (495) 625-23-42, +7 (4967) 73-37-49, Факс: +7 (4967) 33-05-27
 Email: fibkh@fibkh.serpukhov.su

21.09.2012 № 254-2115
 На № _____ от _____

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о стажировке ассистента кафедры физиологии и биохимии растений
 Уральского федерального университета им. первого
 Президента России Б.Н. Ельцина
 Ермошина Александра Анатольевича

Ермошин А.А. стажировался в лаборатории биотехнологии растений ФИБХ РАН под руководством д.б.н., с.н.с. Руковцовой Е.Б. и к.б.н., н.с. Алексеевой В.В. с 04 сентября 2012 г. по 23 сентября 2012 г. Тема стажировки – «Молекулярно-генетические методы в получении и исследовании трансгенных растений». Общий объем – 94 часа.

За время стажировки Ермошиным А.А. были освоены процедуры выделения и очистки ДНК и РНК растений, тотальной и плазмидной ДНК бактерий, методы количественного определения содержания нуклеиновых кислот, электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном и ПААГ гелях, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), обратная транскрипция и синтез к-ДНК, нозерн-блот гибридизация, технология агробактериальной трансформации растений с целью получения генетически модифицированных растений и способы доказательства их трансгенности.

Цели стажировки Ермошина Александра Анатольевича выполнены.

Зав. лаборатории биотехнологии растений
 д.б.н., проф.
 Зам. директора
 Филиала Института
 биоорганической химии РАН
 ФИБХ РАН

Я.И. Бурьянов

Т.А. Заргарова

21 сентября 2012 г.

